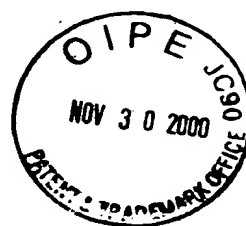


WO 92/13948

File 351:Derwent WPI 1963-2000/UD,UM &UP=200059
(c) 2000 Derwent Info Ltd



?s pn=wo 9213948
S1 1 PN=WO 9213948
?t s1/23/1

1/23/1
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009150089
WPI Acc No: 1992-277527/199234
XRAM Acc No: C92-123505

New tyrosine kinase receptor protein related to FGF receptor proteins -
and corresponding DNA sequences, used in treatment and diagnosis of lung
tumours

Patent Assignee: GEORG-SPEYER-HAUS CHEMOTHERAPEUTISCHES (GEOR-N); BAYER AG
(FARB); CHEMOTHERAPEUTISCHES FORSCHUNG (CHEM-N)
Number of Countries: 015 Number of Patents: 007

Abstract (Basic): DE 4104240 A

Receptor protein TKF (I) is a tyrosine kinase receptor protein related to fibroblast growth factor receptors. They have a specified aminoacid sequence and DNA sequence variants are also claimed. Also claimed are vectors including those sequences and cells transformed with the vector. The new TKFs are determined by method comprising (i) isolation of mRNA, (ii) transcription of mRNA into cDNA, (iii) addn. of a poly dG-tail to the 3-terminus, (iv) amplification of (iii) with pref. at least 20 cycles of a PCR reaction having a first oligo dC-nucleotide primer, pref. of 10 to 25 nucleotides, and a second primer homologous to highly conserved regions of protein tyrosine kinase (PTK) genes, and (v) isolation and characterisation of the prods. The protein is used in the diagnosis of tumours such as lung tumours and in tumour therapy.

USE/ADVANTAGE - Owing to the clinical importance of TKFs, such as in their role during cell transformation and possible increase in tumour growth, it is desirable to find more TKFs and to develop a method for their detection. The PCR method will detect proteins with only one PTK region, since the other primer reacts with the polyG-nucleotide tails, in contrast to prior art methods using two primers both homologous to the conserved TPK regions. The new TFK is useful in tumour diagnosis, i.e in the determin. of the amt. of expression of the gene or prot.

Dwg.0/0

Title Terms: NEW; TYROSINE; KINASE; RECEPTOR; PROTEIN; RELATED; RECEPTOR;
PROTEIN; CORRESPOND; DNA; SEQUENCE; TREAT; DIAGNOSE; LUNG; TUMOUR
Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-015/06; C12N-015/12
International Patent Class (Additional): A61K-037/02; A61K-038/00; A61K-039/00; A61K-039/395;
C07K-013/00; C07K-014/00; C12N-005/10; C12N-015/10; C12N-015/62; G01N-033/53

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



C07K
14/71

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

WO 92/13948

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ :

C12N 15/12, 15/10, C07K 13/00
A61K 37/02, 39/395, G01N 33/53

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

20. August 1992 (20.08.92)

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP92/00127

(22) Internationales Anmeldedatum: 22. Januar 1992 (22.01.92)

(30) Prioritätsdaten:
P 41 04 240.9

12. Februar 1991 (12.02.91) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
GEORG-SPEYER-HAUS CHEMOTHERAPEUTI-
SCHES FORSCHUNGsinstitut [DE/DE]; Paul-
Ehrlich-Straße 42-44, D-6000 Frankfurt/Main 70 (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOLTRICH, Uwe [DE/
DE]; Parkstraße 4, D-6233 Kelkheim (DE). BRÄUNIN-
GER, Andreas [DE/DE]; Marcobrunnerstraße 6, D-6200
Wiesbaden (DE). STREBHARDT, Klaus [DE/DE]; Bie-
denkopf Weg 24, D-6000 Frankfurt a.M. (DE). RÜB-
SAMEN-WAIGMANN, Helga [DE/DE]; Königsstei-
nerstraße 113, D-6232 Bad Soden (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, Heinrich, Fincke, K. usw.; Ko-
pernikusstr. 9, D-8000 München 80 (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (euro-
päisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (euro-
päisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (euro-
päisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (euro-
päisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäi-
sches Patent), JP, LU (europäisches Patent), MC (euro-
päisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäi-
sches Patent), US.

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: CLONING OF A NEW MEMBER OF THE FIBROBLAST GROWTH FACTOR (FGF) RECEPTOR FAMILY

(54) Bezeichnung: KLONIERUNG EINES NEUEN MITGLIEDES DER FAMILIE DER FIBROBLASTEN-WACHS-
TUMSFAKTOREN (FGF)-REZEPTOREN

(57) Abstract

The invention relates to a TKF receptor protein comprising (a) the amino acid sequence illustrated in SEQ ID NO: 1 or (b) variants of the sequence of (a). The invention also relates to a novel PCR process for detecting protein tyrosine kinases by means of PCR.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein TKF-Rezeptor Protein, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es a) die in SEQ ID NO: 1 dar-
gestellte Aminosäuresequenz oder b) Varianten der Sequenz aus (a) umfaßt. Weiterhin betrifft die Erfindung ein neues PCR-Ver-
fahren zum Nachweis von Protein-Tyrosin-Kinasegenen mittels PCR.

Klonierung eines neuen Mitgliedes der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF)-Rezeptoren

B e s c h r e i b u n g

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Protein-Tyrosin-Kinase, das dafür kodierende Gen sowie ein Verfahren zum Nachweis neuer Protein-Tyrosin-Kinasegene mittels einer PCR-Reaktion.

Die Annahme genetischer Schäden als Ursache der Entstehung von Tumoren wurde durch die Entdeckung von zellulären Genen, "Proto-Onkogene" genannt, bestätigt, die in genetisch modifizierter Weise als sogenannte "Onkogene" das neoplastische Wachstum bedingen. Trotz genetischer Vielfalt der Proto-Onkogene können ihre biochemischen Wirkungsmechanismen in 4 Kategorien zusammengefaßt werden:

1. Phosphorylierung von Proteinen (an den Aminosäuren Threonin, Serin und Tyrosin)
2. Metabolische Regulation
3. Kontrolle der Genexpression
4. Beeinflussung der DNA-Replikation.

Ungefähr ein Drittel aller bisher bekannten Onkogene kodiert für Kinasen, die in Proteinen die Aminosäure Tyrosin phosphorylieren und die daher als Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) bezeichnet werden. Viele Onkogene, die für Tyrosin-Kinasen kodieren, wurden zuerst im Genom von onkogenen Retroviren entdeckt. So stellt beispielsweise das im Rous-Sarkoma-Virus vorkommende transformierende v-src-Gen eine Modifikation des zellulären Proto-Onkogens c-src dar. Gene, die zu den PTK-

3

Domäne besitzen: z.B. abl, fgr, src und lck (Hunter, T. and Cooper, J.A., 1985, Ann.Rev.Biochem. 54, 897).

Die PTK-Onkogene wurden ursprünglich entweder als Komponenten von akut transformierenden Retroviren oder durch Transformation von Fibroblasten via Transfektion von DNA aus Tumorzellen identifiziert. Die Produkte folgender retroviraler Onkogene haben PTK-Aktivität: v-src, v-yes, v-fgr, v-fps, v-abl, v-ros, v-fms und v-fes.

Die Gene v-src, v-yes, v-fps, v-ros und v-fms sind onkogene Bestandteile von Hühner-Sarkoma-Viren, v-fgr und v-fes von Katzen-Sarkoma-Viren und v-abl ist ein Onkogen eines Maus-Lymphom-Virus. Eine Analyse der verschiedenen Protein-Tyrosin-Kinasen zeigt eine enge Verwandtschaft über einen Bereich von 260 Aminosäuren, der die katalytische Region umfaßt. In Bereichen, die außerhalb der katalytischen Region liegen, sind die PTKs beträchtlich divergent. Die einzelnen Bereiche entsprechen Domänen, welche die Spezifität der PTKs für ihre Zielproteine bestimmen.

Die Produkte von v-src, v-yes, v-fgr, v-fps, v-fes, v-abl und v-ros zeigen ihre PTK-Aktivität, indem sie in Immunopräzipitat-Reaktionen die schwere Kette des assoziierten Antikörpers und/oder sogar sich selbst phosphorylieren (Autophosphorylierung). In transformierten Zellen liegen diese viralen Proteine nur in geringen Mengen vor, was deren Isolierung und die anschließende Analyse der PTK-Aktivität sehr erschwert.

Im folgenden soll die Bedeutung von Protein-Tyrosin-Kinasen für menschliche Erkrankungen an drei bekannten Protein-Tyrosin-Kinasegenen ausgeführt werden. Das humane HCK-Gen wird in hämatopoietischen Zellen exprimiert. Weiterhin wurde das HCK-Gen der Bande q11-12 des menschlichen Chromosoms 20 zugeordnet. Anomalien in diesem Bereich, dem langen Arm von Chromosom 20, wurden bei zahlreichen Patienten mit hämatologischen

5
FGFs das Tumorwachstum und dessen invasives Verhalten beschleunigen, indem der Tumor verstärkt mit Blutgefäßen versorgt wird. FGFs sind auch in der Lage, die Produktion von Proteasen, wie z.B. des Plasminogen-Aktivators zu induzieren.

Beispiele für Mitglieder der FGF-Familie sind das int-2-Genprodukt, das hst-Genprodukt (Kaposi sarcoma-FGF) und der Keratinozyten-Wachstumsfaktor. Die Wirkung der verschiedenen Wachstumsfaktoren wird durch Bindung an einen Oberflächenrezeptor vermittelt, wodurch sich die intrinsische Kinase-Aktivität des Rezeptors erhöht.

Von der immensen klinischen Bedeutung von FGFs und deren Rezeptoren seien hier nur zwei Beispiele herausgegriffen:

Beim Herpes simplex Virus Typ I konnte gezeigt werden, daß der FGF-Rezeptor an der viralen Bindung und Aufnahme in Vertebratenzellen beteiligt ist (Kaner, R.J. et al. (1990), Science 248, 1410).

Auch bei der Entstehung von rheumatischer Arthritis spielt der FGF-Rezeptor eine Rolle. So wurde nachgewiesen, daß Synovialzellen das bFGF-Gen und das bFGF-Rezeptorgen exprimieren und dadurch auf autokrine Weise zur rheumatischen Arthritis stimuliert werden (Melnik, V. et al. (1990), Arthritis and Rheumatism 33, 493). Weiterhin wurde ein ähnlicher Mechanismus der autokrinen Stimulation über den FGF-Rezeptor auch bei humanen Glioma-Zelllinien entdeckt (Morrison, R.S. et al. (1990), Cancer Research 50, 2524).

Augrund der enormen klinischen Bedeutung von Protein-Tyrosin-Kinasen, insbesondere von Protein-Tyrosin-Kinasen aus der FGF-Rezeptorfamilie, bestand somit ein Bedürfnis, neue Protein-Tyrosin-Kinasen sowie Verfahren zu ihrem Nachweis bereitzustellen.

7

Nukleotid	Austausch	Aminosäure	Austausch
440	T → C	136	Leu → Pro
872	G → A	280	Arg → His
896	C → T	288	Ala → Val
923	A → T	297	Asp → Val
949	G → A	306	Glu → Lys

Die folgenden Mutationen (Nukleotide 1178 und 1232) betreffen die transmembrane Domäne des TKF-Rezeptors. Punktmutationen in diesem Bereich (Nukleotide 1141-1203) können zu onkogenen Veränderungen führen, wie es am Beispiel des neu-Rezeptors gezeigt wurde (Bergmann, C.B. et al. (1986), Cell 45, 649).

Nukleotid	Austausch	Aminosäure	Austausch
1178	C → T	382	Ala → Val
1232	C → A	400	Pro → His

Folgende Mutationen (1276 und 1360) betreffen die Aminosäure Threonin in Positionen, die bei anderen Mitgliedern der FGF-Rezeptor-Familie regulatorische Bedeutung innehaben sollen.

Nukleotid	Austausch	Aminosäure	Austausch
1276	G → A	415	Ala → Thr
1360	C → A	443	Pro → Thr

Die in SEQ ID NO: 1 dargestellte Aminosäuresequenz stellt das gesamte TKF-Rezeptor-Protein dar. Dieses Protein weist 813 Aminosäuren auf. Das TKF-Rezeptorgen-Gen oder Varianten davon können routinemäßig in einem Vektor kloniert werden, so daß dieser Vektor in einer geeigneten Wirtszelle zur Expression gebracht wird, wobei das erfindungsgemäße Protein entsteht. Bevorzugte Wirtszellen sind Mikroorganismen wie E.coli oder Hefe, aber auch höhere Zellen (z.B. Säuger- oder Insektenzellen). Bevorzugte Expressionsvektoren sind z.B. Plasmide, Bakteriophage Lambda für Prokaryonten, Hefevektoren oder virale Vektoren für höhere Zellen (z.B. SV40, Vaccinia, Baculovi-

2. Eine Untergruppe von Rezeptor Protein-Tyrosin-Kinasen unterscheidet sich von anderen Protein-Tyrosin-Kinasen durch ein Aminosäureinsert in der Kinasedomäne. Innerhalb dieser Untergruppe variieren die Längen der Inserts stark. Bei allen bekannten FGF-Rezeptoren ist die Insertlänge jedoch konstant und entspricht mit 19 Aminosäuren der des TKF-Rezeptors.

Weiterhin ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes TKF-Rezeptor-Protein oder Teile davon kodiert. Diese Nukleinsäure kann z.B. genomische DNA oder RNA sein. Vorzugsweise handelt es sich dabei jedoch um ein rekombinantes DNA-Molekül.

Weiterhin ein Gegenstand der Erfindung ist eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, welche

- (a) die in SEQ ID NO: 1 dargestellte kodierende Sequenz,
- (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleinsäuresequenz oder
- (c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b) unter stringenten Hybridisierungsbedingungen hybridisierende Sequenz enthält.

Unter stringenten Hybridisierungsbedingungen im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man, daß eine Hybridisierung auch nach Waschen bei 55°C in einem wäßrigen Niedrigsalz-Puffer (z.B. 0,2 x SSC) noch auftritt (siehe auch Sambrook, J. et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder einen Teil davon enthält. Der Vektor kann in Eukaryonten, Prokaryonten oder in Eukaryonten und Prokaryonten replizierbar sein. Er kann ein in das Genom der Wirtszelle integrierbarer Vektor (z.B. Bacteriophage Lambda) oder ein Vektor

11

In einer Analyse der phylogenetischen Verwandtschaft von Protein-Tyrosin-Kinasen konnten die konservierten Bereiche der katalytischen Domänen dieser Enzyme ermittelt werden (Hanks, S. et al., 1988, Science, 241, 42). Aufgrund dieser computeranalytischen Vergleiche können die PTKs im wesentlichen in zwei Kategorien eingeteilt werden: die Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen und Protein-Tyrosin-Kinasen ohne extrazelluläre Domäne.

Auf dieser Basis wurden dann entsprechende Primer eingesetzt, um bestimmte Gruppen von Protein-Tyrosin-Kinasen zu untersuchen. Durch Verwendung dieser Primer aus konservierten Regionen wird gewährleistet, daß im Rahmen des PCR-Experiments PTKs der Wachstumsfaktor-Rezeptor-Familie amplifiziert werden können.

Ein Nachteil des bekannten Verfahrens ist jedoch, daß zwei unterschiedliche Primer eingesetzt werden müssen, die zu bekannten Protein-Tyrosin-Kinasegenen homolog sind. Dadurch können Gene, die nur eine Homologie zu einem Primer besitzen, durch eine solche PCR-Reaktion nicht amplifiziert werden.

Ein Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren für den Nachweis neuer Protein-Tyrosin-Kinasegene mittels einer PCR-Reaktion, durch welches die Nachteile des Standes der Technik beseitigt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man

- (a) aus dem Ausgangsmaterial mRNA nach an sich bekannten Methoden gewinnt,
- (b) die mRNA aus Schritt (a) mittels reverser Transkription in cDNA umschreibt,
- (c) die cDNA aus Schritt (b) durch terminale Transferase an ihrem 3'-Ende mit einem poly dG-Schwanz versieht,
- (d) das aus Schritt (c) resultierende Produkt mittels einer PCR-Reaktion in Anwesenheit von 2 Primern amplifiziert, wobei der erste Primer Sequenzen enthält, die zu hoch-

13

- (a) Nukleotid 1453 - 1470,
- (b) Nukleotid 1861 - 1878,
- (c) Nukleotid 1921 - 1929,
- (d) Nukleotid 1987 - 2004, oder
- (e) Nukleotid 2041 - 2058.

Ebenfalls ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung des TKF-Rezeptorproteins oder des dafür codierenden Gens im Rahmen der Tumordiagnostik. So haben Vorversuche gezeigt, daß die Expression des TKF-Rezeptorgens in Tumoren und korrespondierenden Referenzgeweben unterschiedlich ist. Es besteht daher die Möglichkeit, aus der Expressionshöhe des Gens bzw. des Proteins auf die Zellentartung zu schließen.

Weiterhin ist auch eine therapeutische Anwendung mit monoklonalen Antikörpern gegen den Rezeptor möglich. So könnten beispielsweise radioaktive Antikörper oder mit einem Zellgift gekoppelte Antikörper gegen Krebszellen eingesetzt werden, die den TKF-Rezeptor tragen. Die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den TKF-Rezeptor ist anhand der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Aminosäuresequenz des TKF-Rezeptorproteins ohne Schwierigkeiten nach bekannten Verfahren möglich. Als Immunogen können das gesamte TKF-Rezeptorprotein oder auch nur kurze (≥ 6 Aminosäuren) Peptidsequenzen daraus verwendet werden.

Schließlich betrifft die Erfindung ein diagnostisches oder therapeutisches Mittel auf Basis eines TKF-Rezeptorproteins, eines dagegen gerichteten Antikörpers oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure. Ein derartiges Mittel kann gegebenenfalls bekannte pharmazeutische Verdünnungs-, Füll-, Träger- und Hilfsmittel enthalten.

Die Erfindung soll weiter durch die Sequenzprotokolle SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:6 zusammen mit den folgenden Beispielen

15

- 50 mmol/l Tris/HCl, pH 8,3 (22°C)
- 75 mmol/l KCl
- 10 mmol/l Dithiotreitol (DTT)
- 3 mmol/l MgCl₂
- 500 µmol/l dNTP-Lösung
- 0,2 µmol/l Oligonukleotid-Primer P6(2) mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz (diese Sequenz entspricht den Nukleotiden 2044 bis 2063 der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz).
- 3,0 µg Gesamt-RNA
- 100 µg/ml Rinderserumalbumin
- 10 Einheiten Reverse Transkriptase (aus Moloney - Murine Leukemia virus)

Das obige Reaktionsgemisch wurde in 20 µl Reaktionsvolumen eine Stunde lang bei 37°C inkubiert.

- 1.2 Die Amplifizierung der cDNA aus 1.1 erfolgte mit zwei zu hoch konservierten Regionen von PTK-Genen komplementären Primern (P6(2) und P5(1)). Die Nukleinsäuresequenz des Primers P6(2) ist bereits oben angegeben. Die Sequenz von P5(1) ist in SEQ ID NO:3 dargestellt (diese Sequenz entspricht den Nukleotiden 1855 bis 1874 der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz).

Reaktionsbedingungen:

- 8,3 mmol/l Tris/HCl, pH 8,8 (22°C)
- 41,7 mmol/l KCl
- 1,25 mmol/l MgCl₂
- 0,01 % Gelatine
- 166,7 µmol/l dNTP-Lösung
- 0,2 µmol/l Primer P6(2) und P5(1)
- 5 Einheiten Taq-Polymerase
- 10 µl cDNA-Syntheseansatz (aus der PTK-spezifischen cDNA-Synthese)

17

halten. Die cDNA für die Tailing-Reaktion wurde wie folgt hergestellt:

Zunächst erfolgte eine Entfernung der restlichen, nicht eingebauten dNTPs aus dem cDNA-Syntheseansatz durch Ultrafiltration mit Millipore UFC3 LGC 25-Filtern. Vor der Reaktion wurde die cDNA 3 Minuten lang in kochendem Wasser denaturiert, dann auf Eis abgekühlt und zum Reaktionsansatz pipettiert. Das Reaktionsgemisch wurde 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Erhitzen für 5 Minuten auf 65°C wurde die Reaktion abgestoppt.

2.2 Als nächster Schritt wurde eine PCR-Reaktion mit Primern durchgeführt, wovon der eine mit einer zum poly dG-Schwanz komplementären Oligo-dC-Sequenz versehen war. Eine derartige PCR wird als Anker-PCR-bezeichnet. Der zweite Primer (P6(2)) war zu konservierten Regionen in Protein-Tyrosin-Kinasen komplementär.

Als Oligo-dC-Primer wurde das Oligonukleotid P12 verwendet, dessen Nukleinsäuresequenz in SEQ ID NO:4 dargestellt ist.

Die Polymerasekettenreaktion wurde in zwei Amplifikationsrunden durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen der ersten Amplifikationsrunden waren wie folgt:

10 mmol/l Tris/HCl, pH 8,8 (22°C)
50 mmol/l KCl
1,5 mmol/l MgCl₂
0,01 % Gelatine
200 µmol/l dNTP-Lösung
0,2 µmol/l der Primer P6(2) und P12
5 Einheiten Taq-Polymerase
10 µl Tailing-Reaktionsprodukt (0,5 bis 100 pg)

Reaktionsbedingungen:

1 ng TKF-Rezeptor Insert (aus Beispiel 2)
10 mmol/l Tris/HCl, pH 8,8 (22°C)
50 mmol/l KCl
1,5 mmol/l MgCl₂
0,01 % Gelatine
0,8 µmol/l α³²P-dCTP (6000 Ci/mmol)
0,8 µmol/l dATP/dGTP/dTTP
0,2 µmol/l der Primer P6(2) und T1
2,5 Einheiten Taq-Polymerase

Das Reaktionsvolumen war 25 µl. Die Durchführung der Reaktion erfolgte in 20 Zyklen bei den oben (in Beispiel 2) genannten PCR-Bedingungen.

Zum Nachweis eines positiven Klons wurde cDNA aus der Genbank auf Filtern immobilisiert und an die radioaktiv markierte DNA-Sonde (1 x 10⁶ dpm/ml Lösung bei einer spezifischen Son-denaktivität von 5 x 10⁹ dpm/µg DNA) hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur war 42°C.

Hybridisierungslösung:

5 x SSC
0,02 mol/l Tris/HCl, pH 7,6 (22°C)
1 x Denhardt-Lösung
10 % Dextransulfat
0,1 % SDS
100 µg/ml Heringssperma DNA
50 % Formamid

Als Waschlösung wurde 2 x SSC, 0,1 % SDS bei einer Waschtemperatur von 42°C eingesetzt.

Es wurde ein positiver Klon gefunden und charakterisiert. Er enthielt die in SEQ ID NO:1 dargestellte Nukleinsäuresequenz.

-27-

690 720
 GTG ATG GAG AGC GTG GTG CCC TCG GAC CGC GGC ACA TAC ACC TGC CTG GTA GAG AAC GCT
 Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Thr Cys Leu Val Glu Asn Ala

750 780
 GTG GGC AGC ATC CGT TAT AAC TAC CTG CTA GAT GTG CTG GAA CGG TCA CCG CAC CGG CCC
 Val Gly Ser Ile Arg Tyr Asn Tyr Leu Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro

810 840
 ATC CTG CAG GCC GGG CTC CCG GCC AAC ACC ACA GCC GTG GTG GGC AGC GAC GTG GAG CTG
 Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Thr Thr Ala Val Val Gly Ser Asp Val Glu Leu

870 900
 CTG TGC AAG GTG TAC AGC GAT GCC CAG CCC CGC ATC CAG TGG CTG AAG CAC ATC GCC ATC
 Leu Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro Arg Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Ala Ile

930 960
 AAC GGC AGC AGC TTC GGA GCC GAC GGT TTC CCC TAT GTG CAA GTC CTA GAG ACT GCA GAC
 Asn Gly Ser Ser Phe Gly Ala Asp Gly Phe Pro Tyr Val Gln Val Leu Glu Thr Ala Asp

990 1020
 ATC AAT AGC TCA GAG GTG GAG GTC CTG TAC CTG CGG AAC GTG TCA GCC GAG GAC GCA GGC
 Ile Asn Ser Ser Glu Val Glu Val Leu Tyr Leu Arg Asn Val Ser Ala Glu Asp Ala Gly

1050 1080
 GAG TAC ACC TGC CTC GCA GGC AAT TCC ATC GGC CTC TCC TAC CAG TCT GCC TGG CTC ACG
 Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Trp Leu Thr

1110 1140
 GTG CTG CCA GAG GAG GAC CCC ACA TGG ACC GCA GCA GCG CCC GAG GCC AGG TAT ACG GAC
 Val Leu Pro Glu Glu Asp Pro Thr Trp Thr Ala Ala Ala Pro Glu Ala Arg Tyr Thr Asp

1170 1200
 ATC ATC CTG TAC GCG TCG GGC TCC CTG GCC TTG GCT GCG CTC CTG CTG CTG GCC GGG CTG
 Ile Ile Leu Tyr Ala Ser Gly Ser Leu Ala Leu Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ala Gly Leu

1230 1260
 TAT CGA GGG CAG GCG CTC CAC GGC CGG CAC CCC CGC CCG CCC GCC ACT GTG CAG AAG CTC
 Tyr Arg Gly Gln Ala Leu His Gly Arg His Pro Arg Pro Pro Ala Thr Val Gln Lys Leu

1290 1320
 TCC CGC TTC CCT CTG GCC CGA CAG TTC TCC CTG GAG TCA GGC TCT TCC GGC AAG TCA AGC
 Ser Arg Phe Pro Leu Ala Arg Gln Phe Ser Leu Glu Ser Gly Ser Ser Gly Lys Ser Ser

- 23 -

1950 1980
 GAC TTT GGG CTG GCC CGC GGC GTC CAC CAC ATT GAC TAC TAT AAG AAA ACC AGC AAC GGC
 Asp Phe Gly Leu Ala Arg Gly Val His His Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Ser Asn Gly

2010 2040
 CGC CTG CCT GTG AAG TGG ATG GCG CCC GAG GCC TTG TTT GAC CGG GTG TAC ACA CAC CAG
 Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln

2070 2100
 AGT GAC GTG TGG TCT TTT GGG ATC CTG CTA TGG GAG ATC TTC ACC CTC GGG GGC TCC CCG
 Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro

2130 2160
 TAT CCT GGC ATC CCG GTG GAG GAG CTG TTC TCG CTG CTG CGG GAG GGA CAT CGG ATG GAC
 Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Ser Leu Leu Arg Glu Gly His Arg Met Asp

2190 2220
 CGA CCC CCA CAC TGC CCC CCA GAG CTG TAC GGG CTG ATG CGT GAG TGC TGG CAC GCA GCG
 Arg Pro Pro His Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Gly Leu Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala

2250 2280
 CCC TCC CAG AGG CCT ACC TTC AAG CAG CTG GTG GAG GCG CTG GAC AAG GTC CTG CTG GCC
 Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Ala Leu Asp Lys Val Leu Leu Ala

2310 2340
 GTC TCT GAG GAG TAC CTC GAC CTC CGC CTG ACC TTC GGA CCC TAT TCC CCC TCT GGT GGG
 Val Ser Glu Glu Tyr Leu Asp Leu Arg Leu Thr Phe Gly Pro Tyr Ser Pro Ser Gly Gly

2370 2400
 GAC GCC AGC AGC ACC TGC TCC TCC AGC GAT TCT GTC TTC AGC CAC GAC CCC CTG CCA TTG
 Asp Ala Ser Ser Thr Cys Ser Ser Ser Asp Ser Val Phe Ser His Asp Pro Leu Pro Leu

2430 2460
 GGA TCC AGC TCC TTC CCC TTC GGG TCT GGG GTG CAG ACA TGA GCA AGG CTC AAG GCT GTG
 Gly Ser Ser Ser Phe Pro Phe Gly Ser Gly Val Gln Thr End

2490 2520
 CAG GCA CAT AGG CTG GTG GCC TTG GGC TTG GGG CTC AGC CAC AGC CTG ACA CAG TGC TCG

2550 2580
 ACC TTG ATA GCA TGG GGC CCC TGG CAG AGT TGC TGT GGC GTG TCC AAG GGC GTG CCC TTG

ERSATZBLATT

-25-

SEQ ID NO:3

ART DER SEQUENZ: Nukleinsäuresequenz

NAME UND HERKUNFT: Synthetischer Oligonukleotidprimer
P5(1)

LÄNGE: 20 Nukleotide

TTTGTCCACC GAGACCTGGC

SEQ ID NO:4

ART DER SEQUENZ: Nukleinsäuresequenz

NAME UND HERKUNFT: Synthetischer Oligonukleotidprimer
P12

LÄNGE: 33 Nukleotide

GATTTTCAGAG AACTAAACCC CCCCCCCCCC CCC

SEQ ID NO:5

ART DER SEQUENZ: Nukleinsäuresequenz

NAME UND HERKUNFT: Synthetischer Oligonukleotidprimer
TKF1

LÄNGE: 28 Nukleotide

GTCCTCAGTC ACCAGCACAT TGCGGGCA

SEQ ID NO:6

ART DER SEQUENZ: Nukleinsäuresequenz

NAME UND HERKUNFT: Synthetischer Oligonukleotidprimer
T1

LÄNGE: 21 Nukleotide

TCCCGGAAGT GTATCCACCG G

5. Nukleinsäure,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß sie für ein TKF-Rezeptor Protein und seine Varianten
nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kodiert.
6. Nukleinsäure nach Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß sie ein rekombinantes DNA-Molekül ist.
7. Nukleinsäure nach Anspruch 5 oder 6,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß sie
- (a) die in SEQ ID NO: 1 dargestellte kodierende Sequenz,
 - (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleinsäuresequenz oder
 - (c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b) unter stringenten Hybridisierungsbedingungen hybridisierende Sequenz enthält.
8. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 5 bis 7,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß es eine oder mehrere der folgenden Veränderungen gegenüber der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Aminosäuresequenz aufweist:
- | | | |
|---------|---|-------|
| T (440) | → | C; |
| G (872) | → | A; |
| C (896) | → | T; |
| A (923) | → | T und |
| G (949) | → | A. |

29

- (c) die cDNA aus Schritt (b) durch terminale Transferrase an ihrem 3'-Ende mit einem poly dG-Schwanz versieht,
 - (d) das aus Schritt (c) resultierende Produkt mittels einer PCR-Reaktion in Anwesenheit von 2 Primern amplifiziert, wobei der erste Primer Sequenzen enthält, die zu hochkonservierten Regionen bekannter Protein-Tyrosin-Kinasegene homolog sind, und der zweite Primer ein oligo dC-Nukleotid ist, und
 - (e) die resultierenden PCR-Produkte analysiert und charakterisiert.
14. Verfahren nach Anspruch 13,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man einen ersten Primer verwendet, der zu Protein-Tyrosin-Kinasegenen aus der Familie der Wachstumsfaktorrezeptoren homologe Sequenzen aufweist.
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man die PCR in mindestens 20 Zyklen durchführt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man einen oligo dC-Primer mit 10 bis 25 Nukleotiden Länge verwendet.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man einen ersten Primer verwendet, der einen Bereich aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz oder einer dieser Sequenz im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nukleinsäuresequenz enthält, ausgewählt aus dem folgenden Sequenzabschnitt:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 92/00127

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl.⁵ C 12 N 15/12 C 12 N 15/10 C 07 K 13/00
 A 61 K 37/02 A 61 K 39/395 G 01 N 33/53

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched *

Classification System

Classification Symbols

Int. Cl.⁵ C 12 N C 07 K

Documentation Searched other than Minimum Documentation
 to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *

Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
P, X	The EMBO Journal, vol. 10, No. 6, June 1991, J. PARTANEN et al.: "FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern", pages 1347-1354, see the whole document	1-21
X	Proceedings of the National Academy of Science of the USA, vol. 87, No. 22, November 1990, J. PARTANEN et al.: "Putative tyrosine kinases expressed in K-562 human leukemia cells", pages 8913-8917, see the whole document, especially figure 1, "Conclusion"	1-21
X	Proceedings of the National Academy of Science of the USA, vol. 86, March 1989, A.F. WILKS: "Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction", pages 1603-1607, see the whole document, especially "Strategy", figure 1	13-17

* Special categories of cited documents: ¹⁰

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Δ" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

16 April 1992 (16.04.92)

International Searching Authority

EUROPEAN PATENT OFFICE

Date of Mailing of this International Search Report

21 May 1992 (21.05.92)

Signature of Authorized Officer

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 92/00127

I. KLASSEFIZIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben)⁶

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.C1.5	C 12 N 15/12	C 12 N 15/10
A 61 K 37/02	A 61 K 39/395	G 01 N 33/53
		C 07 K 13/00

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff⁷

Klassifikationssystem

Klassifikationssymbole

Int.C1.5

C 12 N

C 07 K

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹

Art.⁹

Kennzeichnung der Veröffentlichung¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile¹²

Bez. Anspruch Nr.¹³

P, X

The EMBO Journal, Band 10, Nr. 6, Juni 1991, J. PARTANEN et al.: "FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern", Seiten 1347-1354, siehe das ganze Dokument

1-21

X

Proceedings of the National Academy of Science of the USA, Band 87, Nr. 22, November 1990, J. PARTANEN et al.: "Putative tyrosine kinases expressed in K-562 human leukemia cells", Seiten 8913-8917, siehe das ganze Dokument, besonders Figur 1, "Conclusion"

1-21

-/-

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:

- * "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- * "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- * "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- * "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- * "T" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- * "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- * "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- * "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- * "A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16-04-1992

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

21. 05. 92

Internationale Recherchenbehörde

EUROPAISCHES PATENTAMT

Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten

W. Weinberg
W. Weinberg

V. ☒ BEMERKUNGEN ZU DEN ANSPRÜCHEN, DIE SICH ALS NICHT RECHERCHIERBAR ERWIESEN HABEN 1

Gemäß Artikel 17 Absatz 2 Buchstabe a sind bestimmte Ansprüche aus folgende Gründen nicht Gegenstand der internationalen Recherche gewesen, weil sie sich auf Gegenstände beziehen, die zu recherchieren die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich:

1. ☒ Ansprüche Nr. 19

Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 19 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers, (das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird) beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung

2. ☐ Ansprüche Nr. vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich:

3. ☐ Ansprüche Nr. Regel 6.4(a) PCT abgefaßt sind.

weil sie abhängige Ansprüche und nicht entsprechend Satz 2 und 3 der

VI. ☐ BEMERKUNGEN BEI MANGELNDER EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG 2

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der Internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren gezahlt worden sind, nämlich
3. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; sie ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
4. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche eine Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde eine solche Gebühr nicht verlangt.

Bemerkung hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.